

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号
特開2002-272463
(P2002-272463A)

(43)公開日 平成14年9月24日 (2002.9.24)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコト [®] (参考)
C 12 N 15/09		C 12 Q 1/68	A 2 G 0 4 5
C 12 Q 1/68		G 01 N 33/50	T 4 B 0 2 4
G 01 N 33/50		C 12 N 15/00	A 4 B 0 6 3

審査請求 未請求 請求項の数1 OL (全7頁)

(21)出願番号 特願2001-83704(P2001-83704)

(22)出願日 平成13年3月22日 (2001.3.22)

(71)出願人 000000376
 オリンパス光学工業株式会社
 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号

(72)発明者 坂 邦夫
 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 オリ
 パス光学工業株式会社内

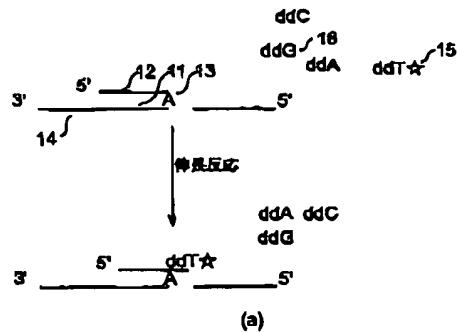
(74)代理人 100058479
 弁理士 鈴江 武彦 (外4名)
 F ターム(参考) 2G045 AA2S AA40 DA12 DA13 DA14
 FA12 FA16 FB01 FB02 FB07
 FB12 GC30 JA01
 4B024 AA11 CAD1 CA09 HA11 HA19
 4B063 QA11 QA12 QQ42 QR62 QS25
 QS32 QS36 QX02

(54)【発明の名称】一塩基多型の型を判定する方法

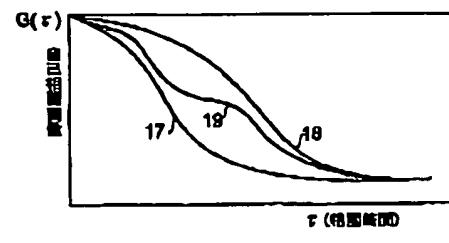
(57)【要約】

【課題】一塩基多型の型を短時間で簡便に判定できる方法を提供すること。

【解決手段】一塩基多型の型を判定する方法であつて、n位に一塩基多型部位を有する標的ポリヌクレオチドにプライマーがハイブリダイズしてなるポリヌクレオチドであつて、前記プライマーの3'末端に位置するヌクレオチドが、前記標的ポリヌクレオチドの(n+1)位のヌクレオチドとハイブリダイズしているポリヌクレオチドを調製する工程と；前記多型部位に存在する検出すべきヌクレオチド種と相補的な修飾ヌクレオチドであつて、更なる伸長反応が停止するよう修飾され標識された修飾ヌクレオチドを用いて伸長反応を行う工程と；前記標識の微小空間における位置変化を経時に計測する工程と；蛍光相關分析法を用いて前工程の計測結果を解析し、標識ヌクレオチドが前記ポリヌクレオチドに取込まれたか否かを決定することにより一塩基多型の型を判定する工程とを備えた方法。



(a)



(b)

(2)

特開2002-272463

2

行い、標識からの信号を検出することにより、変異部分の塩基配列を同定する。

【0004】また、このプライマー伸長法を利用して、マススペクトロスコピーによる検出を用いる方法も考案されている。Tangらは、PROBE (Primer Oligo Base Extension) と呼ばれる方法を開発している (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96: 10016-10020)。この方法は、SNP部位を含む100bp程度の長さのDNAをPCRにより増幅し、脱塩により精製し、5'末にビオチン化又はチオール化等の化学修飾を行い、格子状にウェルを形成したシリコンチップに固定する。固定、洗浄後、チップ上で3種類のdNTPと1種類のddNTPを用いて、プライマー伸長反応を行う。反応終了後、チップの洗浄を行い、TOF MASS用マトリックス溶液添加して試料の結晶化を行い、最後のMALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) マススペクトロスコピーによって、伸長により伸長した塩基種、すなわち1塩基変異部分の塩基種を同定するものである。これらのプライマー伸長反応は、プライマーの3'末端側直近の塩基を直接検出するものであり、1塩基の変異検出に有効な方法である。さらに、MALDI TOFによる方法は、塩基種のラベルが不要であるという効果がある。しかし、これらの技術は、プライマー伸長反応を行う上で標的核酸分子を何らかの固相面上に固相し、さらには固相した核酸分子とプライマーのハイブリダイゼーションおよび伸長反応を行うために、その反応効率は著しく低下し、操作が煩雑である等の問題点がある。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、操作が簡便で、一塩基置換の型を短時間で判定することができる方法を提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】上記課題を解決するため、本発明は、一塩基多型の型を判定する方法であつて、n位 (nは1以上の整数) に一塩基多型部位を有する標的ポリヌクレオチドにプライマーがハイブリダイズしてなるポリヌクレオチドであつて、前記プライマーの3'末端に位置するヌクレオチドが、前記標的ポリヌクレオチドの (n+1) 位のヌクレオチドと対合するようにハイブリダイズしているポリヌクレオチドを調製する工程と；前記一塩基多型部位に存在し得るヌクレオチド種のうち検出すべきヌクレオチド種と相補的な修飾ヌクレオチドであつて、追跡可能な標識で標識され、且つさらなる伸長反応が停止するように修飾された修飾ヌクレオチドを、前記工程で調製されたポリヌクレオチドと混合し、伸長反応を実施する工程と；前記標識の微小空間における位置変化を経時的に計測する工程と；蛍光相関分析法を用いて前工程の計測結果を解析して、検出すべきヌクレオチドと相補的な標識ヌクレオチドが、前記伸長反応工程において前記ポリヌクレオチドに取り込まれたか否かを決定することによって、一塩基多型の型を判定する工程と；を備えた方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 一塩基多型の型を判定する方法であつて、
n位 (nは1以上の整数) に一塩基多型部位を有する標的ポリヌクレオチドにプライマーがハイブリダイズしてなるポリヌクレオチドであつて、前記プライマーの3'末端に位置するヌクレオチドが、前記標的ポリヌクレオチドの (n+1) 位のヌクレオチドと対合するようにハイブリダイズしているポリヌクレオチドを調製する工程と；前記一塩基多型部位に存在し得るヌクレオチド種のうち検出すべきヌクレオチド種と相補的な修飾ヌクレオチドであつて、追跡可能な標識で標識され、且つさらなる伸長反応が停止するように修飾された修飾ヌクレオチドを、前記工程で調製されたポリヌクレオチドと混合し、伸長反応を実施する工程と；前記標識の微小空間における位置変化を経時的に計測する工程と；蛍光相関分析法を用いて前工程の計測結果を解析して、検出すべきヌクレオチドと相補的な標識ヌクレオチドが、前記伸長反応工程において前記ポリヌクレオチドに取り込まれたか否かを決定することによって、一塩基多型の型を判定する工程と；を備えた方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、一塩基多型の型を判定する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】疾患感受性遺伝子や薬物反応に関する遺伝子などを効率よく同定していくためには、信頼性の高いマーカー (Genetic Landmark) が必要であり、そのために制限酵素断片長多型 (RFLP) やVNTR (Variable Number of Tandem Repeat)、マイクロサテライトマークー等のマーカーが使われてきた。しかし、各マーカーともその分布が偏っていたり、数が少ないため遺伝子領域を数Mb程度に較るのが限界であった。この点1塩基変異に基づく多型である一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism; 以下、SNPと称する) は、候補遺伝子の領域を30kb程度まで絞ることが可能であるため、様々な手法が開発されている。

【0003】このような1塩基多型を検出する方法として、プライマー伸長によるものがある (米国特許第6,013,431号)。本方法は、標的遺伝子を一本鎖にした後、固相表面に、例えばビオチン-アビシン反応を介して固相し、1塩基変異のある部分のすぐ隣の3'側からある領域にわたって相補的となるようなプライマーをハイブリダイズさせる。その後、蛍光色素等の標識を付与した塩基アナログ (伸長反応が停止する、例えばdNTP) を共存させ、プライマーの3'側から1塩基、変異に対応したものを伸長させる。その後、洗浄を

50

(3)

特開2002-272463

4

3
分析法を用いて前工程の計測結果を解析して、検出すべきヌクレオチドと相補的な標識ヌクレオチドが、前記伸長反応工程において前記ポリヌクレオチドに取り込まれたか否かを決定することによって、一塩基多型の型を判定する工程と；を備えた方法を提供する。

【0007】本明細書において、「一塩基多型」とは、一塩基変異に基づく遺伝的多型を意味する。

【0008】

【発明の実施の形態】本発明は、一塩基多型の型を判定する方法を提供する。

【0009】本明細書において、「一塩基多型の型を判定する」とは、一塩基変異が生じている部位（一塩基多型部位）に存在するヌクレオチドの種類を推定し、又は決定することをいう。従って、本発明の方法を用いれば、例えば、一塩基多型部位にアデニン、グアニン、又はシトシンの何れかが存在することが知られているときに、当該部位のヌクレオチドをアデニンであると決定すること、又はアデニンでないと決定することができる。

【0010】なお、一塩基多型部位を有する標的のポリヌクレオチドは、以下の実施例では一本鎖ポリヌクレオチドを使用しているが、特に一本鎖に限定されず、例えば二本鎖ポリヌクレオチドを使用してもよい。

【0011】以下、実施例によって、本発明をさらに詳細に説明するが、以下の実施例は、いかなる意味においても、本発明の範囲を限定することを意図したものではない。

【0012】【実施例1】本実施例では、図1を参照しながら、検出すべき一種類のヌクレオチド種と相補的な標識された修飾ヌクレオチドを用いて、一塩基多型部位に前記検出すべきヌクレオチド種が存在するか否かを判定する方法について説明する。

【0013】本実施例の方法を実施するには、まず、プライマー12が、標的一本鎖ポリヌクレオチド11中の一塩基多型部位13に隣接するようにハイブリダイズした部分的二本鎖ポリヌクレオチド14を調製する。

【0014】図1に示されているように、プライマー12の3'末端に存在するヌクレオチドは、一塩基多型部位13に存在するヌクレオチド（図ではアデニン（A））の3'側に隣接するヌクレオチドとハイブリダイズしている。

【0015】部分的二本鎖ポリヌクレオチド14を調製するには、典型的には、標的一本鎖ポリヌクレオチド11にプライマー12をハイブリダイズせねばよい。

【0016】部分的二本鎖ポリヌクレオチド14を調製した後、一塩基多型部位に存在し得るヌクレオチド種のうち検出すべきヌクレオチド種と相補的であり、且つ追跡可能な標識で標識された修飾ヌクレオチド15を部分的二本鎖ポリヌクレオチド3と混合する。図1では、標識された修飾ヌクレオチド15の他に、標識されていない修飾ヌクレオチド16も示されているが、標識されて

いない修飾ヌクレオチド16は必ずしも加える必要はない。

【0017】前記標識は、追跡可能であれば任意の標識であり得るが、好みしい標識は、発光性の標識、とりわけ蛍光標識であり得る。

【0018】図1では、検出すべきヌクレオチド種がアデニンである場合が例示されているので、標識された修飾ヌクレオチドに含まれる核酸塩基はチミンとなっている。

10 【0019】標識された修飾ヌクレオチド15を加えた後には、伸長反応を行う。伸長反応を行うには、酵素、例えば、DNAポリメラーゼなどのポリメラーゼを使用すればよい。

【0020】標識された修飾ヌクレオチド15は、さらなる伸長反応が停止するように修飾されている。「さらなる伸長反応が停止するように修飾された」とは、核酸の伸長反応において、修飾ヌクレオチド15自体はプライマーに付加されてプライマーを伸長させるが、引き続く伸長反応が起こらないように修飾されていることを意味する。それ故、修飾ヌクレオチド15を用いれば、伸長反応は、一塩基だけ伸長しただけで停止する。このような修飾ヌクレオチドは、核酸の塩基配列決定などの分野で多用されているジデオキシヌクレオチドであり得るが、これに限定されない。

【0021】伸長反応は、一塩基だけ伸長して停止するので、標的一本鎖ヌクレオチド11の一塩基多型部位に検出すべきヌクレオチド種が存在するときだけ、部分的二本鎖ポリヌクレオチド14を構成するプライマー12の3'末端に、標識された修飾ヌクレオチド15が付加される。これに対して、標的一本鎖ヌクレオチド11の一塩基多型部位に検出すべきヌクレオチド種が存在しないときには、部分的二本鎖ポリヌクレオチド14に標識された修飾ヌクレオチド15は導入されない。図1の場合、標的一本鎖ヌクレオチド11の中に検出すべきヌクレオチドであるアデニンが含まれているので、標識されたジデオキシチミンが部分的二本鎖ポリヌクレオチド14に導入された様子が示されている。

【0022】伸長反応に統いて、部分的二本鎖ポリヌクレオチド14に取り込まれた、又は取り込まれなかつた前記標識の微小空間における位置変化を経時的に計測する。

【0023】本明細書において、「微小空間」とは、容積が $10^{-21} L$ （1nm四方の立方体の体積に相当する）～ $10^{-3} L$ 、典型的には $10^{-18} L$ ～ $10^{-9} L$ 、最も典型的には $10^{-15} L$ ～ $10^{-12} L$ の空間をいう。

【0024】微小空間の形状は、球状、円錐状、立方体状、直方体状等任意の形状であり得る。

【0025】このような微小空間における標識の位置変化を計測するためには、典型的には、共焦点顕微鏡を使

(4)

特開2002-272463

6

*行われ、極めて短時間で終了し得る。

【0026】共焦点顕微鏡21を用いた検出は、図2に示されているように、

1. レーザー発生装置22からレーザー光を励起光として照射する；
2. フィルター23を通過させた後、レーザー光を集光し、ダイクロイックミラー24によって試料中の一点にレーザー光を照射する；
3. 試料中の蛍光物質をレーザー光で励起して発光させる；
4. ピンホール25を通過させることにより、試料の焦点中の蛍光物質から発せられた蛍光のみを光増倍管(PMT)26で增幅する；
5. データ処理装置27により、増幅した蛍光を解析し、表示装置28に結果を表示することによってなされる。

【0027】共焦点顕微鏡の光源としては、例えば、アルゴンイオンレーザーを使用し得るが、蛍光物質の種類に応じて、波長の異なるクリプトンアルゴンイオンレーザー、ヘリウムネオンレーザー、ヘリウムカドミニウムレーザーも使用できる。

【0028】このような検出方法は、微小空間空間中に存在する標識から発せられる蛍光のみを検出するので、バックグラウンドが極めて少なく、通常の蛍光検出に比べて著しく感度が高い。

【0029】「標識の位置変化の経時的な計測」は、一般的にはミリ秒～分の単位、最も一般的には秒の単位で*

$$G(t)=1+\frac{1}{N} \left[\left\{ \frac{1-y}{1+\frac{t}{\tau_{small}}} \sqrt{\frac{1}{1+S^2 \cdot \frac{t}{\tau_{small}}}} \right\} + \left\{ \frac{y}{1+\frac{t}{\tau_{large}}} \sqrt{\frac{1}{1+S^2 \cdot \frac{t}{\tau_{large}}}} \right\} \right]$$

(ここで、N：蛍光分子の平均数

$\tau_{small}=w_0^2/4D_{small}$: サイズが小さい核酸の並進拡散時間

$\tau_{large}=w_0^2/4D_{large}$: サイズが大きい核酸の並進拡散時間

y=繰り返し数が多い反復配列の割合

S=w_0/z_0である

(なお、w_0は検出領域の径、z_0は領域長、D_{small}とD_{large}は、それぞれサイズが小さい核酸及びサイズが大きい核酸の並進拡散定数である)) を用いて、3. で得た自己相関関数を解析する。

【0034】FCSによるデータ解析には、Evotec BioSystems社から発売されているコンピュータープログラム「FCS」を使用できる。前記工程1～4までの操作時間は、1つの試料当たり10秒未満であり得る。

【0035】このような分析の概念は、図3によって、より明確となろう。すなわち、サイズが小さい場合には

40 ブラウン運動の速度が大きいので、I(t)の周波数が大きい。これに対して、サイズが大きい場合にはブラウン運動の速度が小さいので、I(t)の周波数が小さい。

【0036】従って、式(1)を用いれば、核酸のサイズ、各核酸の割合を推定し得る。

【0037】標一本鎖ポリヌクレオチド11に標識された修飾ヌクレオチド15が取り込まれたときには、標識のブラウン運動の速度は小さくなるのに対して、標一本鎖ポリヌクレオチドに修飾ヌクレオチド15が取り込まれないときには、標識のブラウン運動の速度は大きい。それ故、本発明の方法に蛍光相関分析法を適用することにより、標一本鎖ポリヌクレオチド中に修飾ヌクレオチド15が取り込まれたか否かが分かる。

【0038】図1のグラフのうち、曲線17は、標識されたジデオキシチミジンが取り込まれなかった場合の自己相関関数G(τ)の経時変化を示しており、曲線18は、標識されたジデオキシチミジンが取り込まれた場合

(5)

特開2002-272463

8

の自己相関関数 $G(\tau)$ の経時変化を示している。

【0039】グラフから明らかなように、標識されたジデオキシチミジンが取り込まれた場合と取り込まれなかつた場合とでは、曲線の形状が異なるので、蛍光相関分析法を用いれば、標識されたジデオキシチミジンが取り込まれたか否かを即時に決定することができる。

【0040】実際の測定では、標的一本鎖ポリヌクレオチド11と標識された修飾ヌクレオチド15は、一对一の割合で存在せずに、標識された修飾ヌクレオチド15が標的一本鎖ポリヌクレオチド11よりも多いことが通常である。そのため、曲線17と18の中間に、曲線19のような形状の曲線が得られる場合が多い。

【0041】標識された修飾ヌクレオチド15が標的一本鎖ポリヌクレオチド11に比べて過剰であると、標的一本鎖ポリヌクレオチド11に取り込まれた修飾ヌクレオチド15が極めて僅かとなる。このため、かかる場合に得られる曲線は、曲線17と区別できず、修飾ヌクレオチド15が標的一本鎖ポリヌクレオチド11に取り込まれなかつたものと誤って判断されてしまうことになる。それ故、標的一本鎖ポリヌクレオチド11に取り込まれなかつた修飾ヌクレオチド15の量は、修飾ヌクレオチド15の全量の半分以下であることが望ましい。

【0042】一方、標識された修飾ヌクレオチド15の量が少なすぎると、伸長反応の進行速度が極端に遅くなってしまうので、伸長反応が適切に進行し得る量の標識された修飾ヌクレオチド15を使用することが好ましい。

【0043】以上のように、本実施例の方法を用いれば、一塩基多型部位に検出すべきヌクレオチド種が存在するか否かを簡易且つ迅速に判定することができる。

【0044】本実施例では、所定の部位が一塩基多型部位であることが明らかとなっている場合を例にとって説明を行ったが、本実施例の各工程は、ある部位が一塩基多型部位であるか否かが不明な場合に、当該部位に一塩基多型が存在するか否かを調べるためにも使用できる。すなわち、本発明は、一本鎖標的ポリヌクレオチド中の所定部位に一塩基多型が存在するか否かを調べる方法も提供する。

【0045】所定の部位が一塩基多型部位であることが不明な場合には、当該部位に存在することが知られているヌクレオチド種とは異なるヌクレオチド種と相補的な修飾ヌクレオチドを用いて伸長反応を実施すればよい。当該部位に存在することが知られているヌクレオチド種とは異なるヌクレオチド種と相補的な修飾ヌクレオチドがプライマーに付加されれば、前記所定の部位が一塩基多型部位であると推定される。

【0046】【実施例2】本実施例では、図4を参照しながら、一塩基多型部位に存在し得る複数のヌクレオチド種のうち、一塩基多型部位に何れのヌクレオチド種が存在するかを決定する方法について説明する。

【0047】本実施例の方法を実施するには、まず、プライマー42が、標的一本鎖ポリヌクレオチド41中の一塩基多型部位43に隣接するようにハイブリダイズした部分的二本鎖ポリヌクレオチド44を調製する。部分的二本鎖ポリヌクレオチド43の調製方法は、実施例1に記載したとおりである。

【0048】図4の例では、一塩基多型部位43には、アデニン(A)又はグアニン(G)が存在し得る。

【0049】部分的二本鎖ポリヌクレオチド44を調製した後、一塩基多型部位に存在し得る各ヌクレオチド種と相補的な標識ヌクレオチド45及び46を、部分的二本鎖ポリヌクレオチド43と混合する。図4の例では、標識ヌクレオチド45はジデオキシチミジンであり、標識ヌクレオチド46は、ジデオキシグアノシンである。両標識ヌクレオチドを区別するために、標識ヌクレオチド45と標識ヌクレオチド46には異なる物質を標識することが好ましい。

【0050】標的一本鎖ポリヌクレオチド41中の一塩基多型部位43がアデニンであれば、プライマー42の末端には標識ヌクレオチド45が付加される。標的一本鎖ポリヌクレオチド41中の一塩基多型部位43がシトシンであれば、プライマー42の末端には標識ヌクレオチド46が付加される。

【0051】伸長反応後に、標識ヌクレオチド中の標識の微小空間における位置変化を経時的に計測する。計測方法は、実施例1に記載したとおりであり、標識ヌクレオチドが取り込まれなかつた場合には曲線47が得られ、標識ヌクレオチドが取り込まれた場合には曲線48が得られる。

【0052】計測後、蛍光相関分光法により計測結果を解析する。各プライマーが異なる蛍光標識で修飾されていれば、測定の際に各蛍光標識に適したフィルター等を用いることによって、何れのプライマーが標的ポリヌクレオチドに結合したかを決定できる。蛍光相関分光法を用いて、所定のプライマーが標的ポリヌクレオチドに結合したか否かを決定する方法は、実施例1において前述したとおりである。

【0053】複数種類のプライマーを用いる本実施例の方法によれば、一塩基多型部位に存在するヌクレオチドの種類を正確に決定することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1の方法を示す模式図。

【図2】共焦点顕微鏡の構成を示す図。

【図3】蛍光相関分光法の測定に用いるデータを示す図。

【図4】実施例2の方法を示す模式図。

【符号の説明】

1 1 標的一本鎖ポリヌクレオチド

1 2 プライマー

50 1 3 一塩基多型部位

(6)

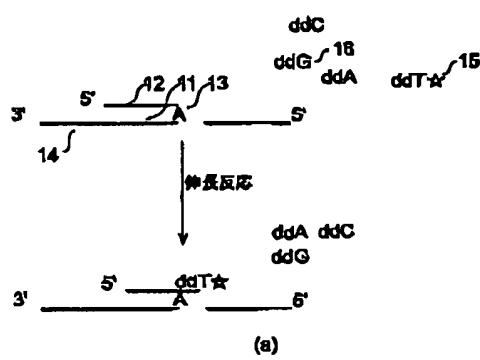
特開2002-272463

10

- 9
 1 4 部分的二本鎖ポリヌクレオチド
 1 5 標識された修飾ヌクレオチド
 1 6 修飾されていない修飾ヌクレオチド
 1 7 曲線
 1 8 曲線
 1 9 曲線
 2 1 共焦点顕微鏡
 2 2 レーザー発生装置
 2 3 フィルター
 2 4 ダイクロイックミラー
 2 5 ピンホール

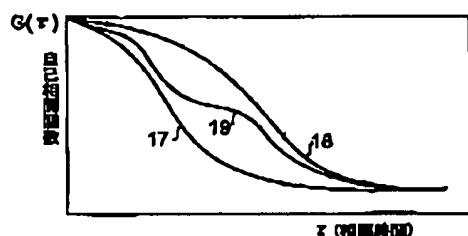
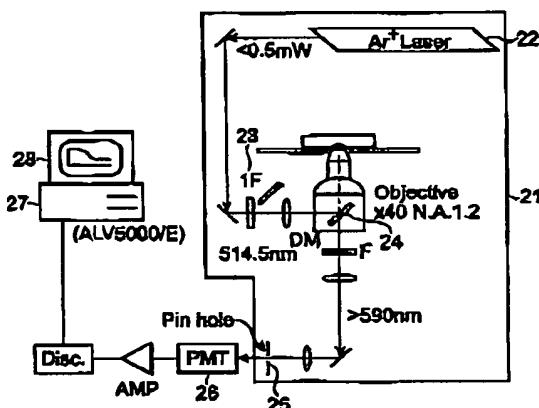
- 2 6 光倍増管
 2 7 データ処理装置
 2 8 表示装置
 4 1 標的一本鎖ポリヌクレオチド
 4 2 プライマー
 4 3 一塩基多型部位
 4 4 部分的二本鎖ポリヌクレオチド
 4 5 標識ヌクレオチド
 4 6 標識ヌクレオチド
 10 4 7 曲線
 4 8 曲線

【図1】



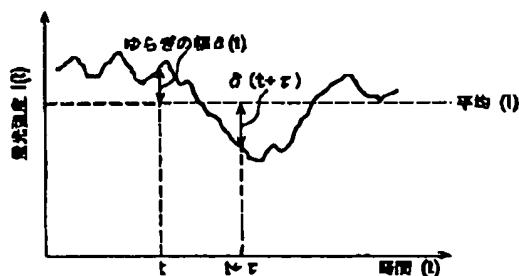
(a)

【図2】



(b)

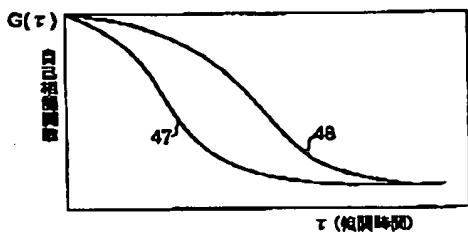
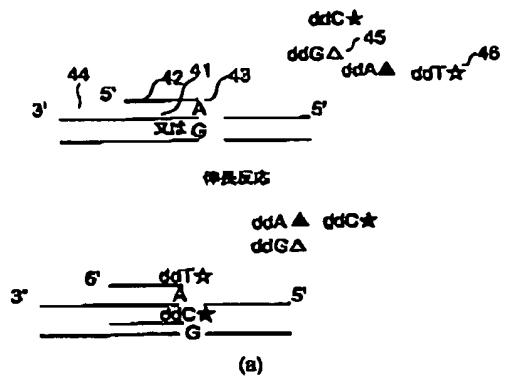
【図3】



(7)

特開2002-272463

【図4】



(b)

JP-A-2002-272463

(54) [Title of the Invention]

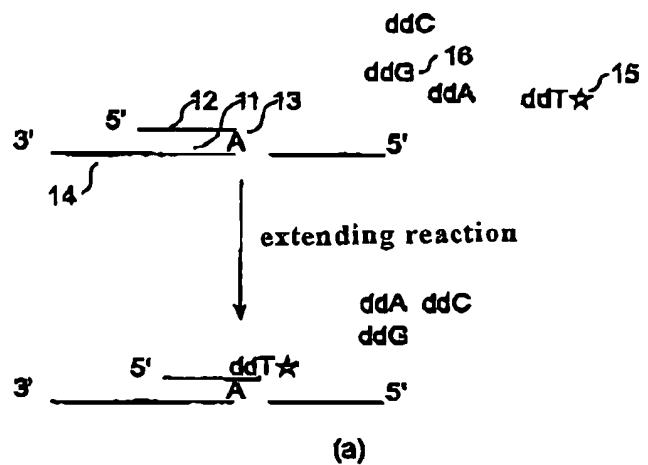
Method for judging type of single nucleotide polymorphism

(57) [Abstract]

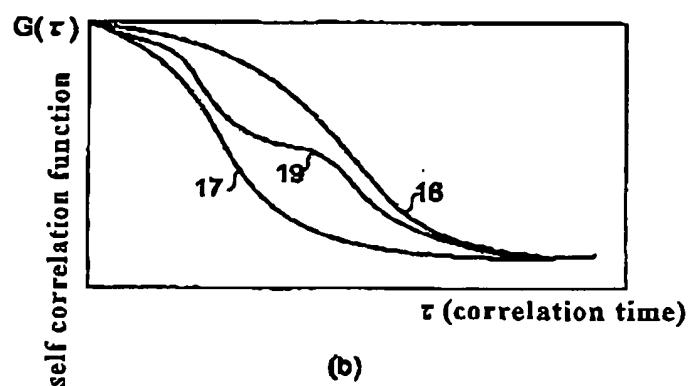
[Target] To provide a method capable of judging a type of single nucleotide substitution in a simple manner and in a short time.

[Solving Means]

A method of judging a type of single nucleotide substitution including a step of preparing a polynucleotide which is formed by a hybridization of a primer with a target polynucleotide having a single nucleotide polymorph site in n-position and in which a nucleotide positioned at a 3'-end of the primer hybridizes with a nucleotide in (n+1)-position of the target polynucleotide; a step of executing an extending reaction by a modified nucleotide which is complementary to a nucleotide species to be detected, present in the polymorph site and which is so modified and marked as to terminate a further extending reaction; a step of measuring a positional change, as a function of time, in a minute space of the marking; and a step of analyzing the result of measurement of the preceding step with a fluorescence correlation analysis to determine whether the marked nucleotide is fetched in the polynucleotide, thereby judging a type of the single-nucleotide polymorphism.



(a)



(b)

10/587941

IAP11 Rec'd PCT/PTO 02 AUG 2006

[Claims]**[Claim 1]**

A method of judging a type of single-nucleotide polymorphism comprising:

a step of preparing a polynucleotide which is formed by a hybridization of a primer with a target polynucleotide having a single nucleotide polymorph site in an n-position (n being an integer of 1 or larger) and in which a nucleotide positioned at a 3'-end of said primer hybridizes so as to correspond to a nucleotide in an (n+1)-position of the target polynucleotide; a step of executing an extending reaction by mixing, with the polynucleotide prepared in the preceding step, a modified nucleotide which is complementary to a nucleotide species to be detected, among the nucleotide species that can be present in said single nucleotide polymorph site and which is marked with a traceable marker and so modified as to terminate a further extending reaction; a step of measuring a positional change, as a function of time, in a minute space of said marker; and a step of analyzing the result of measurement of the preceding step with a fluorescence correlation analysis to determine whether the marked nucleotide, complementary to the nucleotide to be detected, is fetched in said polynucleotide in said extending reaction step, thereby judging a type of the single-nucleotide polymorphism.

[Detailed Description of the Invention]**[0001]****[Technical Field to which the Invention Belongs]**

The present invention relates to a method for judging a type of single

nucleotide polymorphism.

[0002]

[Prior Technology]

In order to efficiently identify a disease sensitive gene or a pharmaceutical reaction-related gene, a marker of high reliability (genetic landmark) is required, and, for this purpose, various markers have been used such as a restriction fragment length polymorphism (RFLP) type, a VNTR (variable number of tandem repeat) type, or a microsatellite marker. However, each of these markers can only limit the gene region to about several Mb, because of a deviated distribution or a limitation in number. On the other hand, single nucleotide polymorphism (hereinafter represented as SNP), which is a polymorphism based on a mutation of a single base, is capable of limit the region of a candidate gene to a region of about 30 kb, and various methods have been developed.

[0003]

A method for detecting such single-nucleotide polymorphism utilizes a primer extension (USP 6,013,431). In this method, a target gene is formed as a single chain, and is immobilized on the surface of a solid phase, for example by a biotin-avidin reaction, and a primer, which is complementary over a certain region from a 3'-side immediately adjacent to the site of single-base mutation, is hybridized. Thereafter, a base analog (capable of terminating the extending reaction, such as ddNTP) provided with a marker such as a fluorescent dye, is made present thereby causing an extension, corresponding to the single-base mutation, from the 3'-side of the primer. Then a washing is executed and a signal from the marker is detected to identify the base sequence of the mutation

part.

[0004]

Also there has been conceived a method of detection by mass spectroscopy, utilizing such primer extension method. Tang et al. have developed a method called PROBE (primer oligo base extension) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96: 10016 - 10020). In this method, a DNA of a length of about 100 bp including an SNP site is amplified by PCR, purified by desalting, subjected to a chemical modification at 5'-end such as a biotination or a thiolation, and immobilized on a silicon chip bearing lattice-shaped wells. After immobilization and washing, a primer extension reaction is executed on the chip, utilizing three dNTPs and a ddNTP. After the reaction, the chip is washed, then a TOP MASS matrix solution is added to crystallize the sample, and finally MALDI (matrix assisted laser desorption ionization) mass spectroscopy is executed to identify the base species extended by the extension reaction, namely the base species of the single-base mutation site. Such primer extension reaction is to directly detect a base immediately close to the 3'-terminal of the primer, and is a method effective for detecting a single-base mutation. Also the method by MALDI TOF provides an effect of not requiring a labeling on the base species. However, such technologies require to immobilize the target nucleic acid molecules on a certain solid surface in order to execute a primer extending reaction, and to execute a hybridization and an extending reaction of the primer with the immobilized nucleic acid molecules, thus involving drawbacks of a significantly lowered reaction efficiency and complex operations.

[0005]

[Problems the Invention is to Solve]

An object of the present invention is to provide a method capable of judging a type of single nucleotide substitution with simple operations and in a short time.

[0006]**[Means for Solving the Problems]**

In order to accomplish the aforementioned object, the present invention provides a method of judging a type of single-nucleotide polymorphism including a step of preparing a polynucleotide which is formed by a hybridization of a primer with a target polynucleotide having a single nucleotide polymorph site in an n-position (n being an integer of 1 or larger) and in which a nucleotide positioned at a 3'-end of said primer hybridizes so as to correspond to a nucleotide in an (n+1)-position of the target polynucleotide; a step of executing an extending reaction by mixing, with the polynucleotide prepared in the preceding step, a modified nucleotide which is complementary to a nucleotide species to be detected, among the nucleotide species that can be present in said single nucleotide polymorph site and which is marked with a traceable marker and so modified as to terminate a further extending reaction; a step of measuring a positional change, as a function of time, in a minute space of said marker; and a step of analyzing the result of measurement of the preceding step with a fluorescence correlation analysis to determine whether the marked nucleotide, complementary to the nucleotide to be detected, is fetched in said polynucleotide in said extending reaction step, thereby judging a type of the single-nucleotide polymorphism.

[0007]

In the present specification, "single nucleotide polymorphism" means a genetic polymorphism based on a single-base mutation.

[0008]

[Embodiments of the Invention]

The present invention provides a method for judging a type of single nucleotide polymorphism.

[0009]

In the present specification, "judging a type of single nucleotide polymorphism" means to estimate or to determine species of a nucleotide, present in the site showing a single nucleotide mutation (single nucleotide polymorphism site). Therefore, the method of the present invention allows, for example when adenine, guanine or cytosine is known to be present in the single nucleotide polymorphism site, to determine the nucleotide in such site as adenine or other than adenine.

[0010]

The target polynucleotide including a single nucleotide polymorphism site is a single-chain polynucleotide in the following examples, but it is not restricted to a single chain and a duplex-chain polynucleotide may also be utilized.

[0011]

In the following, the present invention will be further clarified by examples, but the following examples do not intend, in any meaning, to restrict the scope of the present invention.

[0012] [Example 1]

The present example explains, with reference to Fig. 1, a method of

judging, utilizing a marked and modified nucleotide complementary to a nucleotide type to be detected, whether the nucleotide type to be detected is present in the single nucleotide polymorphism site.

[0013]

For executing the method of the present example, at first prepared is a partially duplex-chain polynucleotide 14 in which a primer 12 is hybridized so as to be adjacent to a single nucleotide polymorphism site 13 in a target single-chain polynucleotide 11.

[0014]

As shown in Fig. 1, a nucleotide, present at a 3'-end of the primer 12, is hybridized with a nucleotide which is adjacent, at the 3'-side, to a nucleotide (adenine (A) in case of Fig. 1) present in the single nucleotide polymorphism site 13.

[0015]

The partially duplex-chain polynucleotide 14 can be prepared typically by hybridizing the primer 12 with the target single-chain polynucleotide 11.

[0016]

After the preparation of the partially duplex-chain polynucleotide 14, a modified nucleotide 15, which is complementary to a nucleotide type to be detected among the nucleotide types that can be present in the single nucleotide polymorphism site and which is marked with a traceable marker, is mixed with the partially duplex-chain polynucleotide 3. Fig. 1 shows a non-marked modified nucleotide 16 in addition to the marked and modified nucleotide 15, but the non-marked modified nucleotide 16 need not necessarily be added.

[0017]

The marker may be any arbitrary marker that is traceable, but a preferable marker may be a light-emitting marker, particularly a fluorescent marker.

[0018]

Fig. 1 shows, as an example, a case where the nucleotide type to be detected is adenine, so that the nucleic acid base contained in the marked modified nucleotide is thymine.

[0019]

After the addition of the marked modified nucleotide 15, an extending reaction is executed. The extending reaction may be executed utilizing an enzyme, such as DNA polymerase.

[0020]

The marked modified nucleotide 15 is so modified as to terminate a further extending reaction. "Modification so as to terminate a further extending reaction" means that the modified nucleotide 15 itself is so modified, in the nucleic acid extending reaction, as to be added to the primer thereby extending the primer, but as not to cause a subsequent extending reaction. Therefore, utilizing the modified nucleotide 15, the extending reaction is terminated after an extension by one base. Such modified nucleotide may be dideoxynucleotide that is often utilized for example in the field of base sequence determination of nucleic acid, but is not restricted thereto.

[0021]

As the extending reaction is terminated after an extension by one base, the marked modified nucleotide 15 is added to the 3'-end of the primer 12 constituting the partially duplex-chain polynucleotide 14, only when the

nucleotide type to be detected is present at the single nucleotide polymorphism site of the target single-chain nucleotide 11. On the other hand, the marked modified nucleotide 15 is not introduced into the partially duplex-chain polynucleotide 14, when the nucleotide type to be detected is not present in the single nucleotide polymorphism site of the target single-chain nucleotide 11. Fig. 1 shows a state where the marked dideoxythymidine is introduced into the partially duplex-chain polynucleotide 14, as the target single-chain nucleotide 11 contains adenine constituting the nucleotide to be detected.

[0022]

Subsequent to the extending reaction, a positional change of the marker, that is incorporated or not incorporated into the partially duplex-chain polynucleotide 14, in a minute space, is measured as a function of time.

[0023]

In the present specification, "minute space" means a space of a volume of from 10^{-21} L (corresponding to a volume of a cube with a side of 1 nm) to 10^{-8} L, typically from 10^{-18} to 10^{-9} L, and most typically from 10^{-15} to 10^{-12} L.

[0024]

The minute space may have an arbitrary shape, such as spherical, conical, cubic or rectangular parallelopiped.

[0025]

For measuring the positional change of the marker in such minute space, a confocal microscope is typically employed. The confocal microscope itself is already known in this field.

[0026]

The detection with the confocal microscope is executed, as shown in Fig.

2, by:

1. emitting, from a laser light generating apparatus 22, a laser light as an excitation light;
2. condensing the laser light after passing a filter 23, and irradiating a point of the sample with the laser light by a dichroic mirror 24;
3. exciting a fluorescent substance in the sample with the laser light, thereby causing a light emission;
4. passing only a fluorescence, emitted from the fluorescent substance at the focal point in the sample, through a pinhole 25 and amplifying the fluorescence by a photomultiplier (PMT) 26; and
5. analyzing the amplified fluorescence by a data processing apparatus 27 and displaying a result on a display apparatus 28.

[0027]

As a light source for the confocal microscope, for example an argon ion laser may be employed, but a krypton argon ion laser, a helium-neon laser, or a helium-cadmium laser may also be employed according to the type of the fluorescent substance.

[0028]

Such detection method, being adapted to detect only the fluorescence emitted from the target present in the minute space, has an extremely low background and shows a significantly higher sensitivity, in comparison with an ordinary fluorescence detection.

[0029]

“Measurement of positional change of the marker as a function of time” is generally executed in an order of from a millisecond to a minute, and most

ordinarily in an order of a second, and is thus completed within an extremely short time.

[0030]

After the measurement, the result of measurement is analyzed, and thereby determining whether a marked nucleotide complementary to the nucleotide to be detected has been introduced into the target polynucleotide.

[0031]

The analysis of the result of measurement is preferably executed by a fluorescence correlation analysis. The "fluorescence correlation analysis" means a method of measuring, over a predetermined time, an intensity of the fluorescence emitted by several fluorescent substances in average (a fluorescent substance in certain cases) present in the minute space, obtaining a self correlation function of a fluctuation in the fluorescence resulting from Brownian movement, and analyzing such function to obtain various data relating to the fluorescent substance. The fluorescence correlation analysis (hereinafter called FCS (fluorescence correlation spectrometry)) itself is already known, and, reference may be made for example to JP-A-11-502608 for details thereof.

[0032]

Following operations are executed for analyzing the result of measurement by FCS:

[0033]

1. A minute space is irradiated with a laser light;
2. An intensity of fluorescence, emitted from the fluorescent substance present in such minute space, is measured as a function of time, thereby obtaining data as shown in Fig. 3;

3. An expected value of a product of fluorescence intensities $I(t)$ and $I(t+\tau)$ at two different times, to obtain a self correlation function $G(\tau) = \langle I(t) I(t+\tau) \rangle$;

4. The self correlation function obtained in 3 is analyzed, utilizing a following equation 1:

[mathematic 1]

$$G(t)=1+\frac{1}{N} \left[\left\{ \frac{1-y}{1+\frac{t}{\tau_{\text{small}}}} \sqrt{\frac{1}{1+S^2 \cdot \frac{t}{\tau_{\text{small}}}}} \right\} + \left\{ \frac{y}{1+\frac{t}{\tau_{\text{large}}}} \sqrt{\frac{1}{1+S^2 \cdot \frac{t}{\tau_{\text{large}}}}} \right\} \right]$$

(wherein:

N: average number of fluorescent molecules;

$\tau_{\text{small}} = w_0^{2/4} D_{\text{small}}$: parallel diffusion time of nucleic acid of small size;

$\tau_{\text{large}} = w_0^{2/4} D_{\text{large}}$: parallel diffusion time of nucleic acid of large size;

y: proportion of a repeating sequence of a large repeating number;

S: w_0/z_0

(w_0 being a diameter of a detection area; z_0 being a length of the area; D_{small} and D_{large} being parallel diffusion constants respectively of nucleic acid of a small size and nucleic acid of a large size)).

[0034]

For the data analysis by FCS, there may be employed a computer program "FCS" commercialized from Evotec BioSystems Inc. An operation time of the steps from 1 to 4 may be less than 10 seconds per a sample.

[0035]

Concept of such analysis will be made clearer by making reference to Fig.

3. More specifically, in case of a smaller size, $I(t)$ has a higher frequency because of a larger velocity of Brownian movement. In case of a larger size, $I(t)$ has a lower frequency because of a smaller velocity of Brownian movement.

[0036]

Therefore, the equation (1) allows to estimate a size of nucleic acid and a proportion of nucleic acids.

[0037]

When the marked modified nucleotide 15 is incorporated in the target single-chain nucleotide 11, the velocity of Brownian movement of the marker becomes smaller. On the other hand, when the modified nucleotide 15 is not incorporated in the target single-chain nucleotide, the velocity of Brownian movement of the marker remains large. It is therefore possible, by applying the fluorescence correlation spectrometry in the method of the invention, to judge whether the modified nucleotide 15 is incorporated in the target single-chain polynucleotide.

[0038]

Among the graphs shown in Fig. 1, a curve 17 shows a change in time of a self correlation function $G(\tau)$ when the marked didexoythymidine is not incorporated, while a curve 18 shows a change in time of the self correlation function $G(\tau)$ when the marked didexoythymidine is incorporated.

[0039]

As will be apparent from the graphs, the curves assume different forms respectively when the marked didexoythymidine is incorporated and when the marked didexoythymidine is not incorporated, so that the fluorescence correlation spectrometry allows to immediately determine whether the marked didexoythymidine has been incorporated.

[0040]

In an actual measurement, it is usual that the target single-chain polynucleotide 11 and the marked modified nucleotide 15 do not exist in 1:1

proportion, but the marked modified nucleotide 15 is present in a larger amount than the target single-chain polynucleotide 11. Therefore, a curve of a shape as indicated by 19 is often obtained between the curves 17 and 18.

[0041]

When the marked modified nucleotide 15 is present in excess with respect to the target single-chain polynucleotide 11, the modified nucleotide 15 incorporated in the target single-chain polynucleotide 11 represents only a very small amount. Therefore, a curve obtained in such case may be undistinguishable from the curve 17, and may be judged that the modified nucleotide 15 has not been incorporated in the target single-chain polynucleotide 11. Therefore, an amount of the modified nucleotide 15 that has not been incorporated in the target single-chain polynucleotide 11 is preferably a half or less of a total amount of the modified nucleotide 15.

[0042]

On the other hand, as an excessively small amount of the marked modified nucleotide 15 extremely retards the progress of the extending reaction, it is preferable to utilize the marked modified nucleotide 15 in such an amount that the extending reaction can proceed appropriately.

[0043]

As explained above, the method of the present example allows to judge, in simple and prompt manner, whether the nucleotide type to be detected is present in the single nucleotide polymorphism site.

[0044]

The present example has been explained by a case, as an example, where a site is already made clear as a site having the single nucleotide polymorphism,

but the steps of the present example may also be utilized, in a case where it is unclear whether a site has a single nucleotide polymorphism, in order to investigate whether such site has a single nucleotide polymorphism. Thus, the present invention also provides a method of investigating whether a single nucleotide polymorphism is present in a predetermined site of a target single-chain polynucleotide.

[0045]

When it is unclear whether a predetermined site has a single nucleotide polymorphism, the extending reaction may be executed with a modified nucleotide, complementary to a nucleotide type which is different from the nucleotide type known to be present in such site. When the modified nucleotide, complementary to a nucleotide type which is different from the nucleotide type known to be present in such site, is added to the primer, the predetermined site is estimated as a site having a single nucleotide polymorphism.

[0046] [Example 2]

The present example explains, with reference to Fig. 4, a method of determining a nucleotide type present in a single nucleotide polymorphism site, among the plural nucleotide types that can be present in the single nucleotide polymorphism site.

[0047]

For executing the method of the present example, at first prepared is a partially duplex-chain polynucleotide 44 in which a primer 42 is hybridized so as to be adjacent to a single nucleotide polymorphism site 43 in a target single-chain polynucleotide 41. The preparation of the partially duplex-chain polynucleotide 43 may be executed as described in Example 1.

[0048]

In the example shown in Fig. 4, adenine (A) or guanine (G) may be present at the single nucleotide polymorphism site 43.

[0049]

After the preparation of the partially duplex-chain polynucleotide 44, marked nucleotides 45, 46, which are complementary to the nucleotide types that can be present in the single nucleotide polymorphism site, are mixed with the partially duplex-chain polynucleotide 43. In the example shown in Fig. 4, the marked nucleotide 45 is dideoxythymidine, and the marked nucleotide 46 is dideoxyguanosine. In order to distinguish both marked nucleotides, it is preferable to mark the marked nucleotide 45 and the marked nucleotide 46 with different substances.

[0050]

In the case that adenine is present in the single nucleotide polymorphism site 43 of the target single-chain polynucleotide 41, the marked nucleotide 45 is added to an end of the primer 42. Also in the case that cytosine is present in the single nucleotide polymorphism site 43 of the target single-chain polynucleotide 41, the marked nucleotide 46 is added to an end of the primer 42.

[0051]

After the extending reaction, a positional change of the marker in a minute space, in the marked nucleotide, is measured as a function of time. The measuring method is the same as described in Example 1, and a curve 47 is obtained when the marked nucleotide is not incorporated, while a curve 48 is obtained when the marked nucleotide is incorporated.

[0052]

After the measurement, the result of measurement is analyzed by the fluorescence correlation spectrometry. When the primers are marked with different fluorescent markers, it is possible, by employing for example filters matching the fluorescent markers at the measurement, to determine which primer is bonded to the target polynucleotide. The method of determining whether the predetermined primer is bonded to the target polynucleotide by the fluorescence correlation spectrometry is the same as described in Example 1.

[0053]

The method of the present example, utilizing primers of plural types, allows to exactly determine the type of nucleotide present in the single nucleotide polymorphism site.

[Brief Description of the Drawings]

[Fig. 1] A schematic view showing a method of Example 1.

[Fig. 2] A view showing a structure of a confocal microscope.

[Fig. 3] A view showing data to be used for the measurement with fluorescent correlation spectrometry.

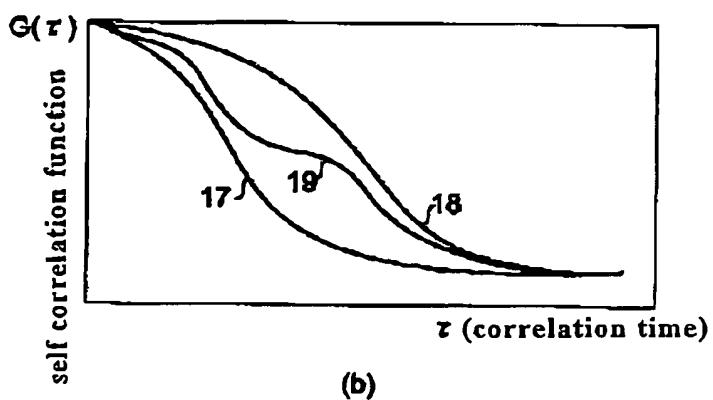
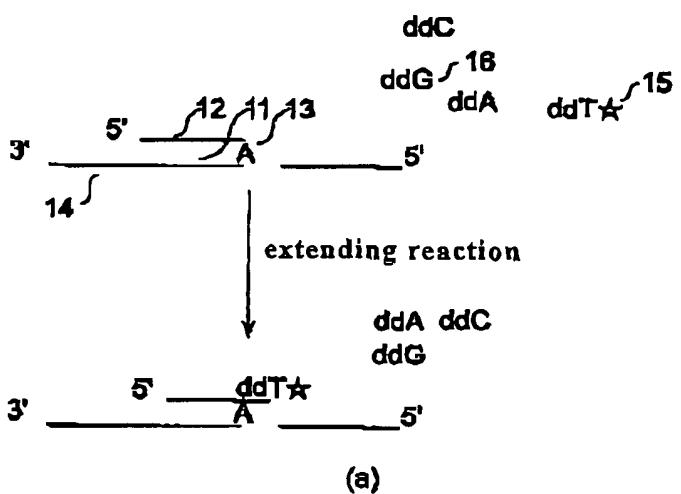
[Fig. 4] A schematic view showing a method of Example 2.

[Description of Symbols]

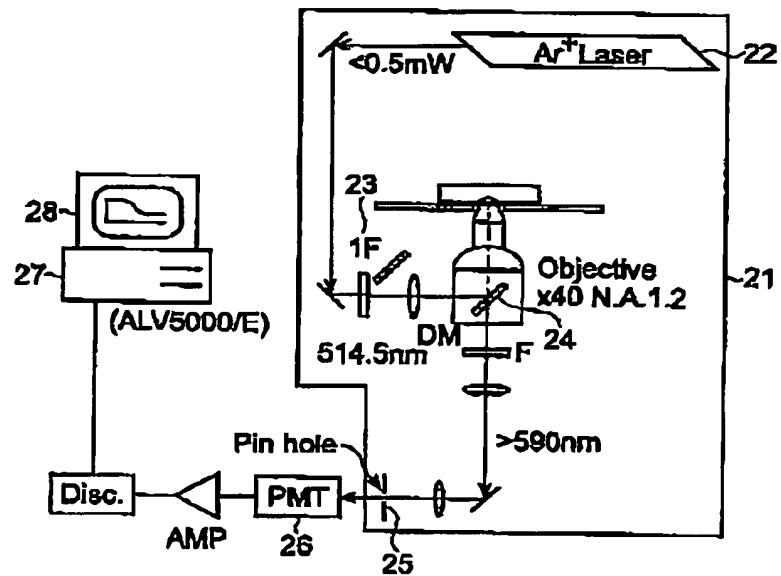
- 11 target single-chain polynucleotide
- 12 primer
- 13 single nucleotide polymorphism site
- 14 partially duplex-chain polynucleotide
- 15 marked modified nucleotide
- 16 non-modified modified nucleotide
- 17 curve

- 18 curve
19 curve
21 confocal microscope
22 laser generating apparatus
23 filter
24 dichroic mirror
25 pinhole
26 photomultiplier
27 data processing apparatus
28 display apparatus
41 target single-chain polynucleotide
42 primer
43 single nucleotide polymorphism site
44 partially duplex-chain polynucleotide
45 marked nucleotide
46 marked nucleotide
47 curve
48 curve

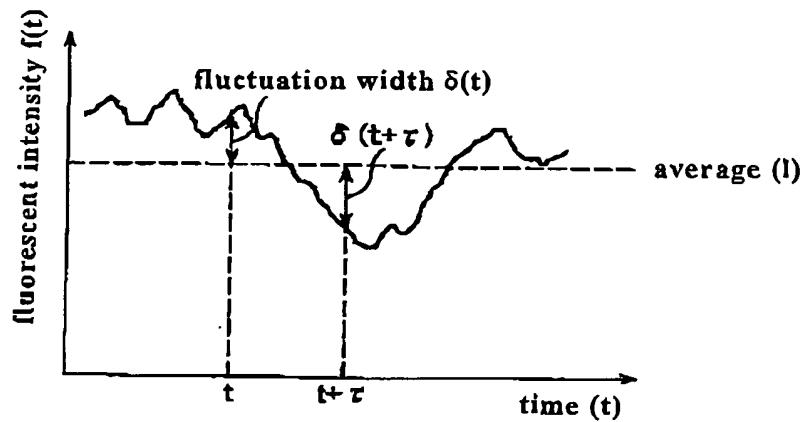
[Fig. 1]



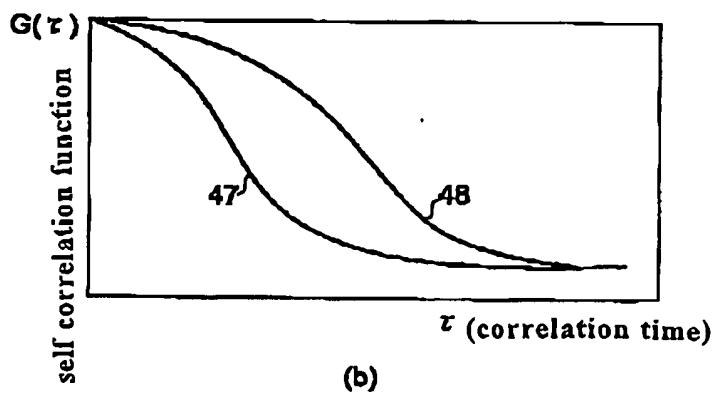
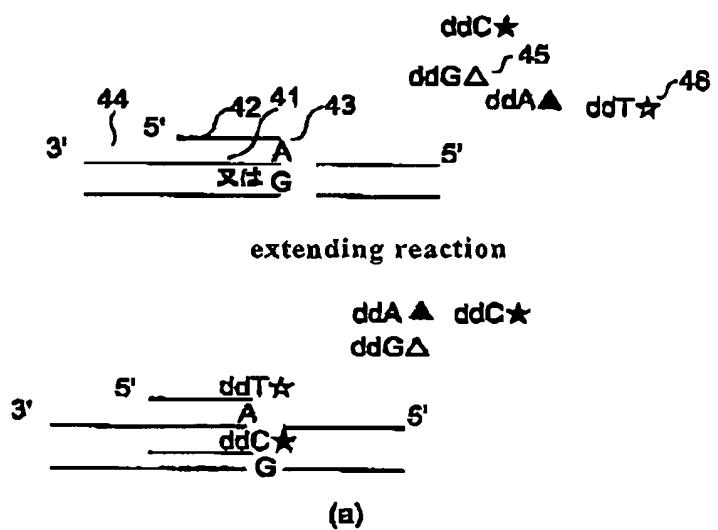
[Fig. 2]



[Fig. 3]



[Fig. 4]



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADING TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.